

ARLEIDE DA CUNHA SANTIAGO FILHA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOCITOQUÍMICO DO OVÁRIO DE
FÊMEAS JOVENS DE *Loxosceles intermedia*, MELLO-LEITÃO, 1934
(ARANEAE: SICARIIDAE)**

**CURITIBA
2003**

ARLEIDE DA CUNHA SANTIAGO FILHA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOCITOQUÍMICO DO OVÁRIO DE
FÊMEAS JOVENS DE *Loxosceles intermedia*, MELLO-LEITÃO, 1934
(ARANEAE: SICARIIDAE)**

Monografia apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas,
Departamento de Biologia-Celular,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora Prof^ª Cloris Ditzel Faraco

**CURITIBA
2003**

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	i
RESUMO.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A importância de <i>Loxosceles intermedia</i>	1
1.2 O estudo da ovogênese.....	2
1.3 Descrição do ovário de <i>L.intermedia</i>	3
1.4 A importância da caderina na formação dos tecidos e na ovogênese.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. METODOLOGIA.....	8
3.1 Manutenção e escolha dos espécimes.....	8
3.2 Análise externa das aranhas jovens.....	8
3.3 Processamento do material para morfologia.....	8
3.4 Processamento do material para a imunocitoquímica: Detecção da presença de caderinas.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1 Análise externa das aranhas jovens.....	10
4.2 Análise morfológica do ovário jovem de <i>L. intermedia</i>	11
4.3 Análise imunocitoquímica.....	13
5. FIGURAS.....	14
6. CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1: Esquema do ovário de <i>Drosophila</i>	3
QUADRO 2: Anatomia de aranhas	4
FIGURA 1 a: Vista do bulbo copulatório de <i>Loxosceles intermedia</i>	15
FIGURA 1 b: A vista geral dorsal de fêmea jovem.....	15
FIGURA 1 c: Vista geral de macho jovem	15
FIGURA 2: Testículos de aranhas jovens.....	16
FIGURA 3: Vista ventral do abdômen de fêmea jovem.....	17
FIGURA 4: Abertura genital da fêmea adulta	18
FIGURA 5 a: Vista geral do ovário de <i>L. intermedia</i>	19
FIGURA 5 b: Ovócitos no lado ventral do ovário.....	19
FIGURA 6: Ovócitos com RNA citoplasmático	20
FIGURA 7: Ovócitos de estágio I - III.....	21
FIGURA 8: Células associadas ao ovócito	22
FIGURA 9: Ovócitos aparentemente dos dois lados do ovário.....	23
FIGURA 10: Ovócitos de aranha jovem processados para o reativo de Schiff.....	24
FIGURA 11: Ovócito de aranha adulta tratado com PAS.....	25
FIGURA 12 a: Grânulos no oviduto de fêmeas jovens.....	26
FIGURA 12 b: Ovo de <i>L. intermedia</i> mostrando o córion	26
FIGURA 13: Ovócito no lúmen do ovário de fêmea adulta	27
FIGURA 14: Ovócito no lúmen do ovário, evidenciando estruturas do córion.....	28
FIGURA 15: Ovócitos no estágio I marcados com anticorpo para caderina.....	29
FIGURA 16: Ovócitos de estágio II à IV marcados com anticorpo para caderina.....	30
FIGURA 17: Grânulos, no interior do ovócito, marcados com anticorpo para caderina.	31

FIGURA 18:	Face ventral do ovário marcada com anticorpo para caderina.....	32
-------------------	--	-----------

RESUMO

Loxosceles intermedia é uma aranha peçonhenta que vive em ambientes antrópicos e se encontra em grande quantidade na região sul e sudeste do Brasil. Sua incidência nas regiões urbanas tem sido o motivo do alto número de acidentes causados por sua picada em humanos. Este fato estimulou o estudo do sistema reprodutor desta espécie para contribuir com dados que poderão ser utilizados no controle populacional de *L. intermedia*.

O sistema reprodutor da fêmea jovem foi comparado com o da fêmea adulta. Não há parâmetros de diferenciação entre os sexos desta espécie, enquanto jovens. As aranhas utilizadas foram mantidas em laboratório e os ovários processados em historresina JB4 para análise em microscópio de luz. Alguns materiais foram processados por imunocitoquímica com anticorpo primário pan-caderina e o secundário conjugado com peroxidase. A parede ovariana da aranha jovem apresenta apenas ovócitos imaturos, os quais no início do desenvolvimento apresentam um grande núcleo com cromossomos evidentes, mostrando etapas de divisão celular. O citoplasma dos ovócitos mais desenvolvidos apresenta alta concentração de RNAs. As células associadas ao ovócito no menor estágio de desenvolvimento são, possivelmente, as células que darão origem ao pedúnculo, que liga o ovócito à parede ovariana. Não foram encontrados produtos de secreção no lúmen do ovário de fêmeas jovens de *L. intermedia*, ao contrário das fêmeas adultas. Observou-se a presença de caderina na membrana do ovócito imaturo, o qual se encontra entre células do epitélio ovariano.

1. Introdução

1.1 A importância de *Loxosceles intermedia*

Loxosceles intermedia Mello-Leitão, 1934, é um artrópodo classificado na ordem Araneae, família Sicariidae. Caracteriza-se, dentre os da sua família, por apresentar uma cor marrom avermelhada, seis olhos, dispostos em três díades, pedipalpo copulador com bulbo simples e abertura genital não esclerotizada. É uma aranha peçonhenta que apresenta um veneno de ação citotóxica. Em geral *L. intermedia* tem afinidade por ambientes antrópicos, vivendo em regiões urbanas e portanto sendo uma dos maiores responsáveis por acidentes, causados por animais peçonhentos, em Curitiba e região metropolitana. Mais de 1500 casos são registrados por ano (Andrade et al, 2000). Oliveira e colaboradores (1999), através do método ELISA, observaram que a fêmea de *L. intermedia* apresenta um veneno com maior potencial dermonecrótico do que o encontrado no macho.

Muitos trabalhos têm sido realizados sobre o veneno de *L. intermedia* (Araújo et al, 2003; Monteiro et al, 2002; Andrade et al, 1999; entre outros) e apenas um manuscrito descreve o comportamento sexual de *L. intermedia* (Fischer e Vasconcelos-Neto, 2000)

L. intermedia pode pôr, a cada postura, em média 20 ovos (Andrade et al, 2000); e o tempo médio de incubação desses ovos, até a eclosão, é de 46 dias (Fischer, 1996).

Após a eclosão do ovo, as aranhas são denominadas de pré-larvas (apresentam poucos movimentos, são cegas, e ainda não têm todas as suas estruturas formadas), fazem uma muda ou ecdise e passam a ser chamadas de larvas, as quais já possuem alguns movimentos, mas somente após uma segunda ecdise, as aranhas denominadas de ninfa I terão movimentos rápidos e conseguirão comer. Nesta etapa elas saem da ooteca. A aranha marrom apresenta 4 a 7 mudas para alcançar a maturidade (Fischer 1996), mas o número de mudas em Arachnida pode variar para cada indivíduo (Francke e Sissom, 1984).

O sistema reprodutivo de *L. intermedia* tem sido alvo de estudos no nosso laboratório por ser possível fonte de dados que possam contribuir para pesquisas de

controle populacional desta espécie. Este trabalho relata o estudo do sistema reprodutor da fêmea jovem, dando ênfase aos processos da ovogênese.

1.2 O estudo da ovogênese

Ovogênese, a diferenciação do ovócito, difere da espermatogênese por vários fatores. Enquanto o espermatozóide é essencialmente uma célula-núcleo móvel, o gameta formado pela ovogênese contém todos os fatores precisos para iniciar e manter o metabolismo de um indivíduo até o tempo específico. Portanto, na ovogênese, é necessário um gasto muito grande para preparar um citoplasma com todas as moléculas necessárias para o início do desenvolvimento. Considerando este gasto metabólico, entendemos por quê na maioria das espécies o número de gametas femininos é menor que o de masculinos, pois o ovócito desenvolve um citoplasma consideravelmente complexo (Gilbert, 1994).

Alguns pesquisadores descreveram o sistema reprodutivo de aracnídeos, mas nenhum deu ênfase à ovogênese de aranhas, exceto Morishita (2003). Os artrópodes compõem um filo parafilético. Portanto, ao estudar uma classe, podemos compara-la com outras já estudadas.

Warburg e colaboradores (1995) descreveram o ovário do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, H. & E., como consistindo de três tubos longitudinais com cinco ramificações que conectam os tubos entre si. Na parte ventral do ovário encontram-se ovócitos de diferentes tamanhos ligados a ele por um pedúnculo.

Ikuta e Makioka (1997), estudando o crustáceo *Argulus japonicus* Thiele, descrevem seu ovário como estrutura única, mediana, semelhante a um saco. Esta estrutura conteria, na parede dorsal, um germário com ovogônias, ovócitos imaturos em estado pré-vitelogênico e células somáticas jovens. A parede ventral do ovário conteria ovócitos menores próximos ao germário e ovócitos maiores mais abaixo.

Para entender o que acontece em aranhas, também buscamos informações no grupo mais estudado dos artrópodos: os insetos. Muitos estudos têm sido feitos com ovários de insetos (Mazzini, 1985; Giorgi, 1993 e Viscuso, 1997, entre outros).

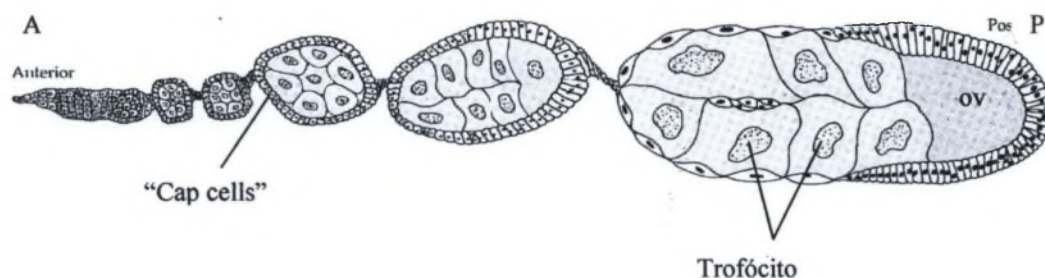
De uma maneira geral os ovários dos insetos são formados por um número variável de ovaríolos. Cada ovaríolo está constituído por um germinário, com

ovogônias envoltas por células foliculares, um vitelário, onde ocorre a atividade vitelogênica, e um pedúnculo (Quadro 1). Cada ovariolo apresenta duas células-tronco de linhagem germinativa que mantêm a produção de ovócitos (Xie, 2000).

Quando o ovariolo apresenta apenas células foliculares, este é chamado de panoístico. Quando além de células foliculares o ovariolo também apresenta trofócitos, este é chamado de meroístico. Os trofócitos ou “nurse cells” são células de mesma origem que o ovócito que parecem providenciar o desenvolvimento do ovócito com o transporte de macromoléculas e até ribossomos para o citoplasma do ovócito através de pontes intercelulares. Trofócitos também são encontrados em outros invertebrados como celenterados, anelídeos e moluscos (Garcia e Fernández, 2001).

Nos insetos, a vitelogenina pode tanto ser captada pelos ovócitos através da hemolinfa como pode ser por eles sintetizada. Não foram ainda observadas células trofocitárias, e nem foi ainda descrito o processo de vitelogênese em *L. intermedia*.

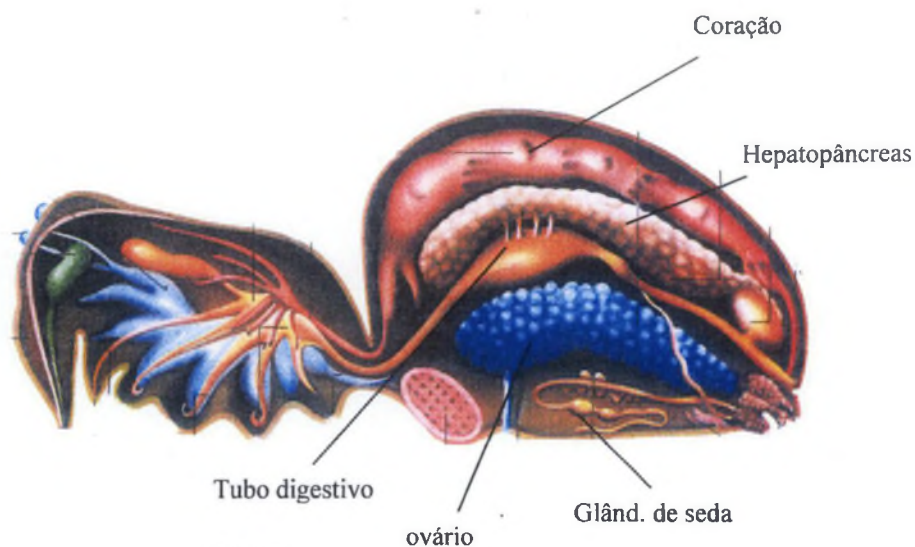
Quadro 1: Esquema do ovário de *Drosophila*: Pólos anterior (A) e posterior (P). Ovócito (ov) localizado posteriormente (Figura extraída do livro de Gilbert, 1994. p. 814)



1.3 Descrição do ovário de *L. intermedia*

O sistema reprodutor feminino de *L. intermedia* se caracteriza por apresentar um par de ovários tubulares localizados ventralmente no abdômen, entre o trato digestivo e glândulas de seda, um padrão semelhante ao descrito para outras aranhas (Quadro 2). O sistema é envolto pelo hepatopâncreas, o qual preenche o abdômen. Cada ovário apresenta um oviduto, sendo que cada um se funde, em estrutura única, formando o útero (Morishita et al, 2003), o qual desemboca na abertura genital. As fêmeas também apresentam um par de espermatecas cujos espermodutos terminam na abertura genital.

Quadro 2: Esquema geral da anatomia visceral de aranhas (Figura de “The spider”, 1994)



O lúmen do ovário de fêmeas adultas apresenta grânulos eosinófilos, secretados por células do epitélio, semelhantes aos encontrados no córion do ovo após a postura. Estes grânulos também foram observados em *Baculum thaili* Haus (Viscuso et al, 1997), porém apenas no oviduto.

Os ovócitos, em diferentes estágios de desenvolvimento, se encontram na parede ventral do ovário ligando-se a ele por meio de pedúnculos celulares. Os ovócitos menores, no início do desenvolvimento se encontram alternando-se com células epiteliais. Esta descrição anatômica é semelhante à descrita na aranha *Pamphobeteus sorocabae*, por Valente (1984), e no escorpião *L. quinquestriatus* estudado por Warburg e colaboradores (1994). Miyasaki e colaboradores (2001) também descreveram uma anatomia similar para *Schizomus sawadai*. É observado em *L. intermedia* que à medida que os ovócitos imaturos se projetam para fora da parede epitelial, a lâmina basal é empurrada cobrindo-o até a fase de ovócito maduro. Morishita (2003) define as fases de desenvolvimento do ovócito desde o estágio imaturo I até o estágio VI. O estágio I se caracteriza por diferir das células do epitélio apenas pela morfologia do núcleo. Os ovócitos de estágio II são os que começam a se projetar para fora da face ventral do ovário. O estágio III é caracterizado por ser um ovócito que já apresenta um volume citoplasmático muitas vezes maior que as células do epitélio e que já se encontra preso ao pedúnculo. Ovócitos de estágio IV são os

que começam a apresentar inclusão citoplasmática de pequenos grânulos de vitelo e os do estágio V apresentam grânulos de vitelo maiores em meio aos de menor tamanho. Entre os ovócitos de estágio IV e células do pedúnculo começa a ser evidenciada uma camada protéica. O ovócito de estágio VI é aquele que se encontra em maior tamanho, com células do pedúnculo morfologicamente distintas e com as células imediatamente em contato com o ovócito sendo maiores e mais alongadas.

No momento da postura, os ovócitos são liberados para o lúmen do ovário, de onde migram para a abertura genital passando pelo útero onde poderão ser fecundados. Ao serem internalizados para o lúmen, os ovócitos maduros deixam uma cicatriz formada pela lâmina basal e uma banda protéica que os encobria (Morishita et al, 2003).

1.4 A importância da caderina na formação dos tecidos e na ovogênese

As caderinas, inicialmente descritas apenas para vertebrados, são glicoproteínas transmembrana, cálcio-dependentes. Existem vários tipos de caderinas descritas. As caderinas localizadas nos tecidos epiteliais são as E-caderinas ou uvomorulinas. Estas são as mais bem estudadas. Elas ligam-se a moléculas de actina do citoplasma e fazem ligações, aderentes, homofílicas com outras células (Alberts, et al 1997).

Adesões por moléculas de caderina são determinantes na morfogênese dos tecidos, com diversos efeitos no comportamento da célula. A perda da atividade de E-caderina é o maior determinante da progressão e invasão de tumores (Semb e Christofori, 1998, apud Kovacks e Yap, 2003).

Estudos recentes mostram que a caderina também age no mecanismo de reconhecimento e sinalização celular, devido à sua interação com as muitas moléculas sinalizadoras (Kovacks e Yap, 2003).

Em estudo feito em *Drosophila* demonstrou-se a mediação de E-caderina na ancoragem das células tronco de linhagem germinativa na região do ovário (ver quadro 1), ligando-as às células somáticas do epitélio ou “cap cells” (Song, et al 2002). Ainda em *Drosophila*, outro estudo indica que as adesões homofílicas das DE-caderinas (*Drosophila* E-caderina) mediam a migração de células foliculares em torno das células germinativas (Niewiadowska, et al 1999).

Em *Xenopus* a U-caderina, uma caderina importante na adesão de células do blastóporo, começa a ser armazenada no ovócito no momento da ovogênese, em um estágio do ovócito onde há grande quantidade de síntese de proteínas durante a maturação (Müller, et al 1992).

Não existem estudos que relacionem a presença de caderina com os processos de ovogênese em aranhas, e ainda não se conhece nelas a localização e origem das células germinativas primordiais.

Justificativa

O estudo de ovário de fêmeas adultas tem sido feito no laboratório de biologia do desenvolvimento desta universidade. Porém ainda não se sabe como inicia-se a formação do ovário da fêmea jovem ou como ocorre o desenvolvimento dos primeiros ovócitos. Motivados por estas questões propomos os nossos objetivos.

2. OBJETIVOS

Descrever o ovário de fêmeas jovens de *L. intermedia* com o uso de métodos histo e imunocitoquímicos.

Comparar o ovário da fêmea jovem de *L. intermedia* com o da fêmea adulta.

3. METODOLOGIA

3.1 Manutenção e escolha dos espécimes

As aranhas foram coletadas na região metropolitana de Curitiba, identificadas segundo Gertsch (1967) e mantidas individualmente em potes de plástico em temperatura e fotoperíodo ambiente.

Fischer (1996) estudando a biologia da aranha-marrom, fornece dados comparativos entre o tamanho dos segmentos das pernas da aranha marrom e o estágio de desenvolvimento. Estes dados foram usados na identificação dos instares das aranhas coletadas.

As aranhas, utilizadas para análise morfológica e imunocitoquímica, foram alimentadas regularmente, enquanto as aranhas utilizadas para diferenciação sexual não foram alimentadas por um período mínimo de 2 semanas, para que a presença do alimento no sistema digestivo não alterasse os dados de peso e morfologia. As aranhas jovens selecionadas para os processamentos foram as de 3º ao 7º instar. Aranhas adultas também foram coletadas e processadas para comparação.

3.2 Análise externa das aranhas jovens

Oito aranhas foram analisadas ao microscópio estereoscópico. Foram tiradas as medidas de tamanho, com régua graduada, e peso com balança analítica, conforme tabela 1.

As aranhas foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% em solução tampão de 0,1M pH 7,4; dissecadas e as gônadas retiradas para a verificação da identidade sexual.

3.3 Processamento do material para a morfologia

Onze aranhas foram selecionadas para análise. Os espécimes foram anestesiados com éter etílico e fixados em solução de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2% em solução tampão de 0,1M pH 7,4. Após dissecação, as gônadas

foram processadas e, como não é possível definir o sexo dos espécimes enquanto jovens, alguns testículos também foram processados.

Após desidratação, o material foi infiltrado e incluído em historresina JB4. Foram feitos cortes de 3 e 4µm, os quais foram corados com hematoxilina e eosina, verde de metila ou preparados para o processamento com o reativo de Schiff (PAS). Os cortes foram analisados ao microscópio de luz Zeiss Axiophot.

3.4 Processamento do material para a imunocitoquímica: Detecção da presença de caderinas.

Aranhas no 5º instar foram selecionadas para a análise imunocitoquímica.

As aranhas foram fixadas com paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As aranhas foram lavadas em solução de TTBS (Tris Tween Buffered Saline – Tris pH 7,5 100mM; NaCl 150 mM e Tween 20 0,1% em água destilada), e em seguida por TTBST (TTBS + Triton x-100). Os ovários passaram pela solução bloqueadora da peroxidase endógena (H_2O_2 0,5%) e foram incubados em solução de soroalbumina bovina (BSA) 1% em TTBST e em seguida o material ficou 2h em soro de cabra 10% em solução BSA 0,1% para o bloqueio dos sítios inespecíficos. O material foi deixado “overnight” a 2°C no anticorpo primário anti-caderina, produzido em coelho(exceto o material controle).

No dia seguinte o material foi lavado 3x em TTBST, deixado uma hora em solução de BSA 1%, e duas horas em soro de cabra como no dia anterior, para então ser deixado “overnight” no anticorpo secundário anti-IgG do coelho, produzido em burro.

No terceiro dia de protocolo, o material foi lavado em TTBS e preparado para a reação com diaminobenzidina (DAB, 0,05%, H_2O_2 0,01% em TTBS), para marcar, com cor marrom amarelada, o complexo formado pelos anticorpos mais a peroxidase.

O material foi processado para ser analisado ao microscópio de luz Zeiss Axiophot, foi infiltrado com historesina JB4 e foram feitos cortes de 3µm. Estes foram corados com hematoxilina e eosina (H.E).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise externa das aranhas jovens

As aranhas jovens não apresentavam externamente nenhuma diferença sexual aparente (Figura 1 b e c). O pedipalpo do macho costuma ser diferenciado, apresentando o último segmento (tarso) com o bulbo copulatório (Figura 1 a). Nos jovens, porém este segmento ainda não apresenta bulbo, sendo afinado e semelhante ao das fêmeas. Apenas o pedipalpo de alguns machos já mostrava o tarso mais largo que as fêmeas. O tamanho ou cor do abdômen não indicava a razão sexual dos indivíduos. Observando a tabela 1 poderíamos afirmar que o peso das fêmeas é maior que o dos machos, mas a diferença de peso entre as aranhas poderá ser devida à última alimentação e ao crescimento e não à presença ou ausência de ovócitos. No estudo feito em um indivíduo da classe Scorpiones, Warburg e Rosemberg (1992) já observava que não há relação entre o número de ovócitos e o peso da fêmea. O trabalho de diferenciação sexual externa de jovens de *L. intermedia* teve início no fim do período deste estágio, devido à falta de animais jovens. Este estudo deve ter continuidade com um número maior de espécimes e de características externas observadas.

Característica/aranha	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Massa (g)	0.010	0.020	0.011	0.023	0.025	-----	0.015	0.026
Corpo	6.5	6.8	6.5	6.5	7.0	7.0	6.0	7.5
Forma abdômen	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Oval	Circular	Circular
Perna 1	11.5	12.3	9.8	15.3	12.3	12.8	9.5	10.3
Perna 2	12.5	13.5	10.0	15.8	13.0	10.3	9.5	11.8
Perna 3	10.3	10.8	8.2	13.3	10.8	8.1	8.0	10.3
Perna 4	11.8	13.1	10.3	14.8	13.3	10.6	10.6	11.0
Forma do palpo	Alargado	Fino	Fino	Alargado	Fino	Fino	Fino	Fino
Determinação sexual	Macho	Macho	Macho	Macho	Fêmea	Fêmea	Fêmea	Fêmea
Instar	6 °	6°	5°	7°	6°	5°	5°	6°

Tabela 1: medidas de comprimento em milímetro (mm), medidas de massa em gramas (g). A massa da aranha 6 não foi tomada, as outras medidas foram consideradas.

Devido à dificuldade de diferenciar externamente os machos das fêmeas, foram sacrificados os indivíduos indiscriminadamente e processados para análise. Porém

como este trabalho dá ênfase ao estudo do sistema reprodutor feminino, foram descritos aqueles em que pôde ser detectada a presença de ovários em desenvolvimento. Alguns machos jovens foram processados para registro fotográfico (Figura 2). Estudos posteriores deverão ser feitos com machos jovens para descrever e analisar os testículos e os gametas em desenvolvimento.

Aranhas jovens, observadas externamente, mostram a região da fenda genital ainda não aberta (Figura 3). Esta característica das aranhas jovens é observada tanto para as fêmeas quanto para os machos. Nas fêmeas jovens deve ocorrer, posteriormente, um processo de arranjo celular e até mesmo apoptose de algumas células para que se forme a abertura genital. Em fêmeas adultas é observada uma abertura genital quitinizada, evidente, com espermateca formada (Figura 4).

4.2 Análise morfológica do ovário jovem de *L. intermedia*

A dissecação do abdômen de aranha jovens requereu maiores cuidados, pois os ovários apresentavam-se bastante reduzidos e alguns apresentavam ovócitos transparentes, dificultando a coleta.

O ovário da aranha jovem, pelo menos a partir do quarto instar, apresenta uma morfologia semelhante à da aranha adulta. Os ovócitos se encontram na região ventral do ovário e prendem-se à parede ovariana por meio de pedúnculos (Figura 5).

Uma das diferenças entre o ovário da aranha jovem e o da adulta é a presença, nas jovens, de apenas ovócitos imaturos com citoplasma basófilo, núcleo grande arredondado com grande nucléolo, e nos estágios mais avançados, o começo da formação de grânulos de vitelo no citoplasma. Os ovócitos encontrados na aranha jovem são os de estágio I ao IV (estágios classificados segundo Morishita, 2003). Os ovócitos imaturos apresentam grande quantidade de RNAs, como foi possível observar com a coloração verde de metila para demonstração de RNAs e DNAs (Figura 6). Outra diferença importante encontrada é a grande quantidade de ovócitos em início de desenvolvimento (estágio I), entre células epiteliais de aranhas jovens. Em alguns casos são vistas duas células germinativas em desenvolvimento uma ao lado da outra (Figura 7). As células germinativas se diferenciam das epiteliais por apresentarem aumento do volume citoplasmático e núcleos maiores. Nas células

germinativas, ainda pequenas e entre as células epiteliais, é freqüente a presença de mitoses. Ainda ao redor das células em desenvolvimento são observadas, em média, duas células associadas a elas. Sugere-se que estas sejam células que darão origem ao pedúnculo (Figura 8).

Miyazaki e colaboradores (2001) no trabalho com o aracnídeo *Schizomus sawadai*, relatou a presença de ovócitos imaturos, com citoplasma basófilo na parede dorsal e lateral do ovário, enquanto a parede ventral apresentaria apenas ovócitos maduros. Os autores relacionam esta distribuição dos ovócitos com uma possível localização de um germário na linha dorso-mediana do ovário, contudo os dados apresentados não fornecem evidências conclusivas a este respeito. Esta descrição não se aplica a *L. intermedia*, pois esta apresenta todos os ovócitos na região ventral, enquanto na região dorsal há a presença de apenas células epiteliais. Esta descrição anatômica da disposição dos ovócitos no ovário da aranha-marrom é facilmente observado ao microscópio estereoscópico no momento da dissecação. Muitas vezes nas imagens obtidas, após o processamento para visualização ao microscópio de luz, o ovário não se apresenta polarizado, pois os ovócitos estão dispostos de forma distorcida dando a impressão de que se encontram em ambos os lados do ovário (Figura 9 e 18). Isto se deve à pouca espessura da parede ovariana que dobrou-se no momento do processamento.

Bilinski (1998) sugeriu que, em insetos, os estágios iniciais de ovogênese só ocorrem na fase pupal ou larval. Em aranhas tem sido por nós observado que o desenvolvimento de ovócitos imaturos ocorre mesmo na fêmea adulta, embora o número destes ovócitos em desenvolvimento inicial diminua com o correr do tempo.

Fêmeas jovens de *L. intermedia* não apresentam ovócitos maduros, portanto, também não apresentam cicatriz de liberação de ovos. Reações com o ácido periódico de Schiff não mostraram, nas aranhas jovens, a camada proteica (Figura 10), encontrada logo abaixo da lâmina basal dos ovócitos maduros, como visto nas adultas (Figura 11).

O ovário de fêmeas jovens apresenta lúmen bastante estreito, e não foram nele observados grânulos eosinófilos como os encontrados nas aranhas adultas. Estes grânulos, na adulta, seriam secretados por células epiteliais do ovário e são muito semelhantes aos grânulos encontrados no córion do ovo (Figura 12).

Uma das aranhas adultas processadas, para comparação, estava realizando postura. No lúmen do ovário foi encontrado um ovócito maduro (Figura 13). Este ovócito já apresentava grânulos aderidos à sua superfície, caracterizando o córion. Estes grânulos mostraram-se PAS negativos (Figura 14).

4.3 Análise imunocitoquímica

Os ovários das aranhas jovens tratados para detecção de caderina, apresentaram um resultado semelhante ao encontrado nas fêmeas adultas. A membrana dos ovócitos de estágio I e II foram marcados com o anticorpo da caderina (Figura 15), bem como o envoltório vitelínico dos ovócitos dos estágios III e IV (Figura 16). A presença de caderina na membrana vitelínica dos ovócitos pode ser devida a sua função sinalizadora e de definição do posicionamento na parede ovariana.

Foram encontrados no citoplasma dos ovócitos, grânulos marcados pelo anticorpo da caderina (Figura 17). Estes grânulos podem ser referidos como a síntese das moléculas de caderina que poderão ser usadas nas divisões celulares do embrião, como já sugerido por Müller (1992), ou inicialmente serem a fonte de caderina observada na superfície das células.

Na maioria das aranhas jovens foi observada a marcação para caderina em toda a extensão da parede ventral do ovário, o que pode ser devido ao grande número de células germinativas que se encontram entre as células do epitélio (Figura 18), e mesmo de células epiteliais com potencialidade para constituírem as futuras células de pedúnculo. Morishita (2003) descreve em fêmeas adultas a presença de caderina em apenas alguns trechos do epitélio ventral do ovário, em áreas em que células germinativas em diferenciação são observadas. Provavelmente no ovário adulto a quantidade de células germinativas indiferenciadas vai progressivamente diminuindo à medida que outras células vão finalizando a ovogênese.

Não foi possível, com as técnicas utilizadas, verificar a presença de células auxiliares (trofócitos) no ovário de *L. intermedia*.

5. FIGURAS

FIGURA 1 a: Vista do pedipalpo do macho de *Loxosceles intermedia*. Bulbo copulatório (seta). Aumento de 40x.

FIGURA 1 b: Vista geral dorsal da aranha fêmea jovem. A fêmea já apresenta pedipalpo (P) afilado no sexto instar. Aumento de 10x.

FIGURA 1 c: Vista geral do macho jovem. O pedipalpo (P) é mais alargado na região do tarso no sexto instar. Aumento de 16x.



FIGURA 2: Testículos de aranha jovem. Grande quantidade de células em divisão (setas). Coloração HE, corte de 4 μ m, aumento de 630x.

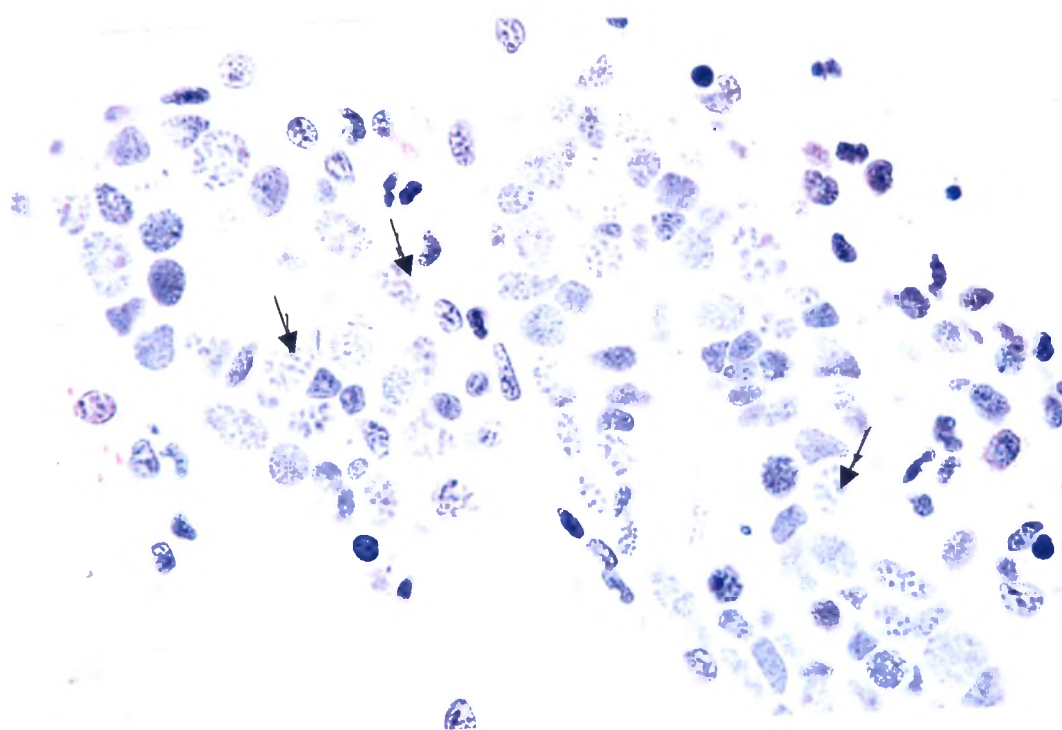


FIGURA 3: Vista ventral do abdômen de aranha jovem. Região da fenda genital fechada (seta). Aumento de 40x.

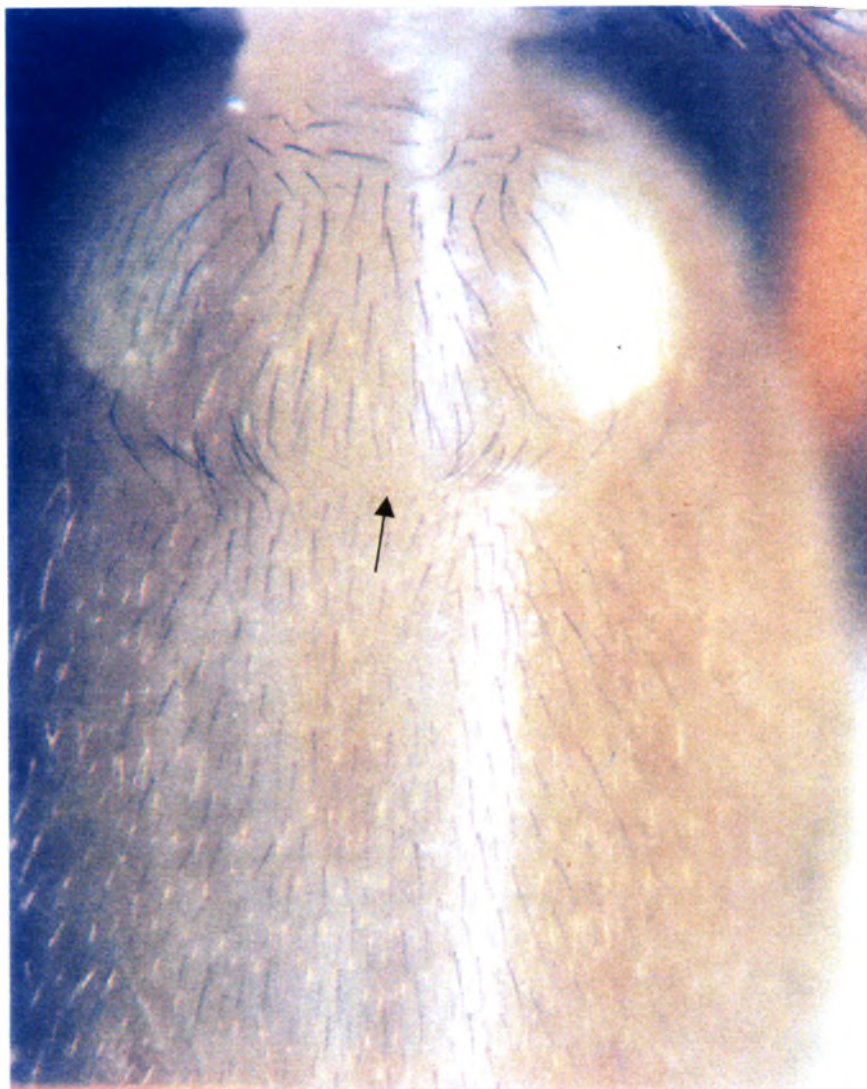


FIGURA 4: Abertura genital da fêmea adulta. Região da fenda genital com abertura evidenciada (seta). Parte anterior da abertura genital bastante quitinizada (Q), região das espermatecas (cabeça da seta). Aumento de 16x.



FIGURA 5 a: Vista geral do ovário de *L. intermedia*. Ovócitos (o) na região ventral do ovário. Grande quantidade de hepatopâncreas (H), fiandeiras (F), parede ventral do corpo (seta). Aumento de 100, coloração H. E., corte de 4 μ m.

FIGURA 5 b: Ovócitos no lado ventral do ovário. Aranha no quarto estágio ninfal. Ovário apresentando somente ovócitos imaturos (ov), que são ligados ao ovário por pedúnculos (P), parede ventral do corpo (seta). Coloração H.E., corte longitudinal de 3 μ m, aumento de 160x.

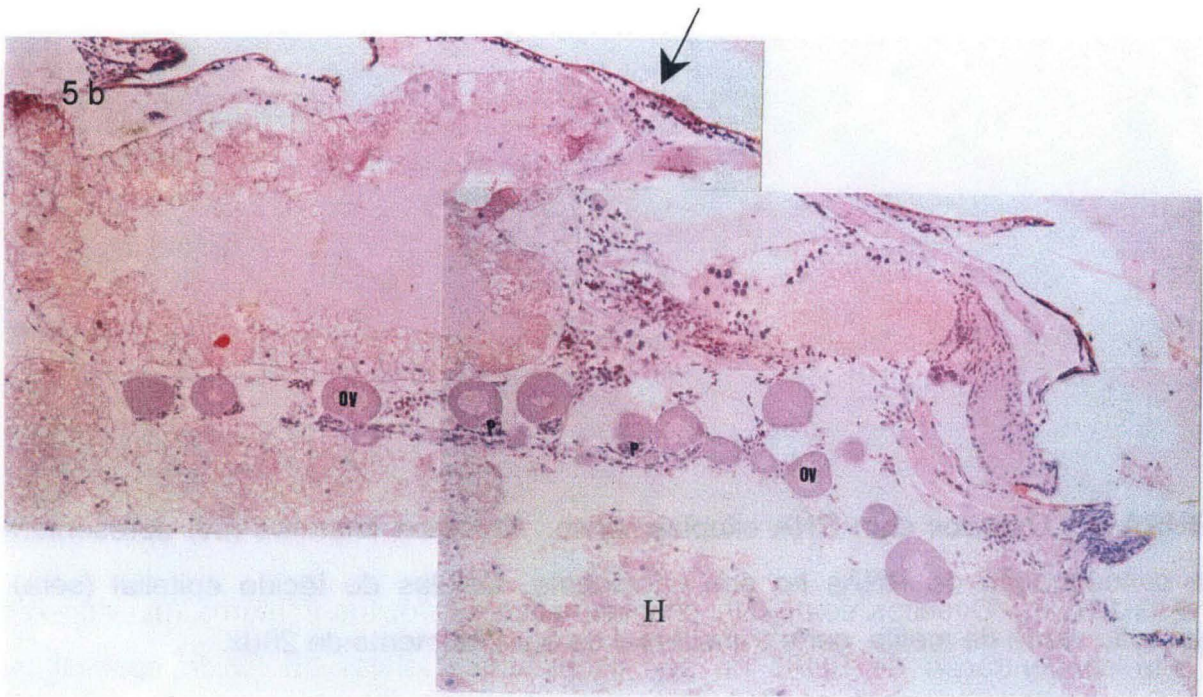
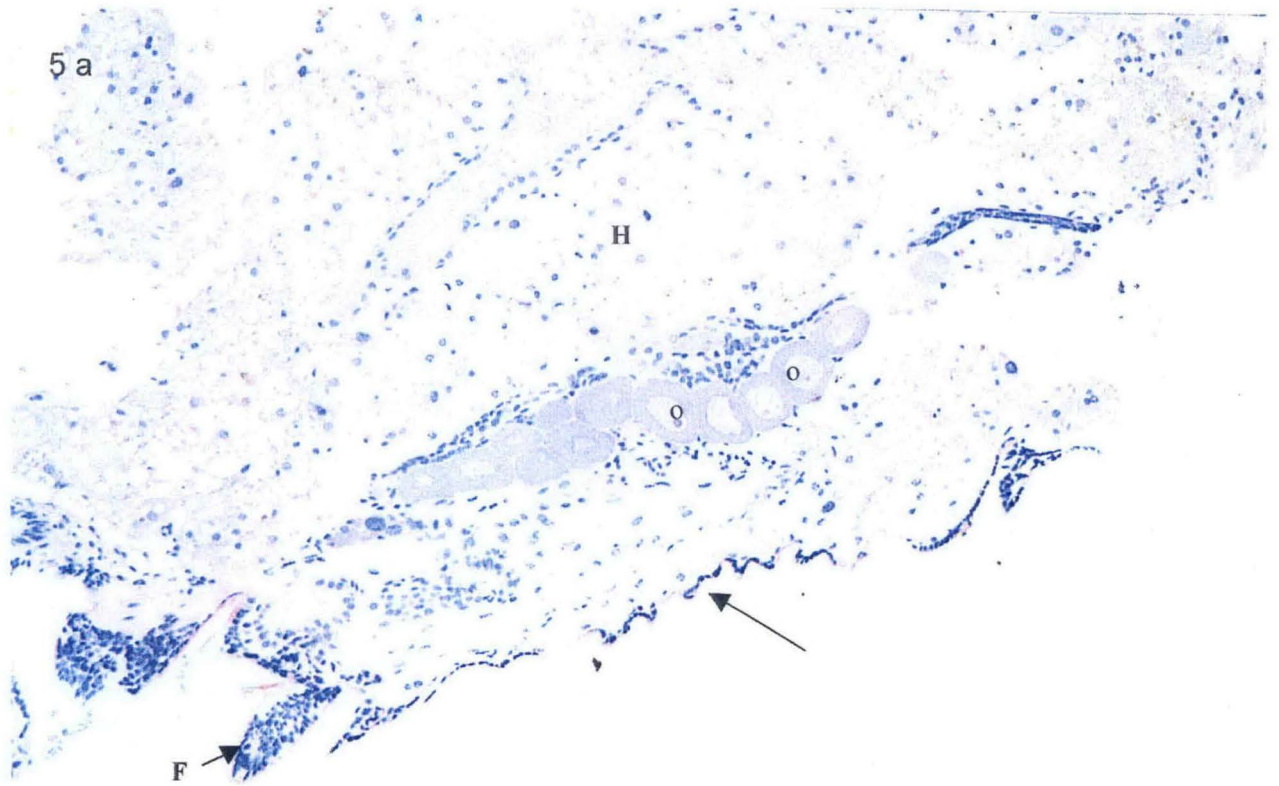


FIGURA 6: Ovócitos com RNA citoplasmático. Ovócitos imaturos (ov) apresentam alta concentração de RNAs no seu citoplasma. Células do tecido epitelial (seta). Coloração verde de metila, corte transversal de 3 μ m, aumento de 200x.

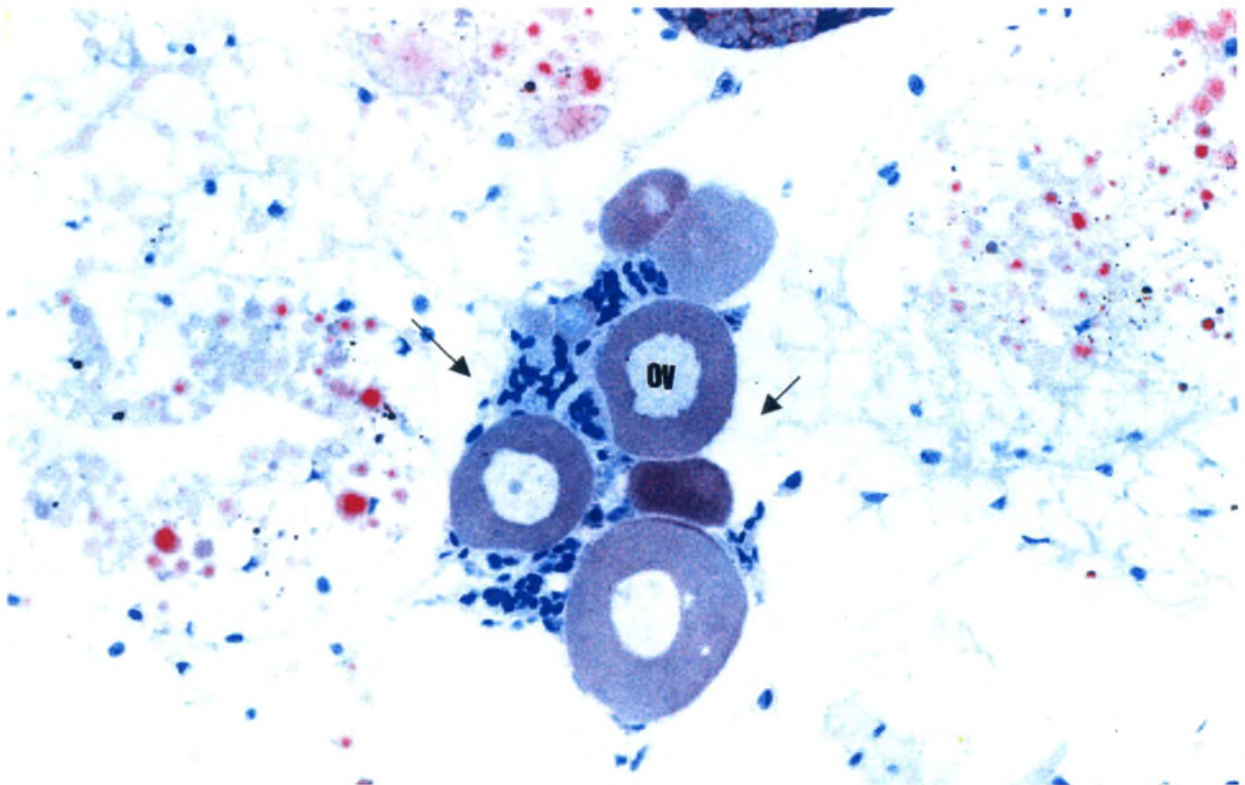


FIGURA 7: Ovócitos em estágio I - III. Ovócitos (Ov) em diferentes graus de maturação. Ovócitos menores de estágio I (o) entre células epiteliais. Coloração H.E., corte transversal de 4 μ m, aumento de 630x.

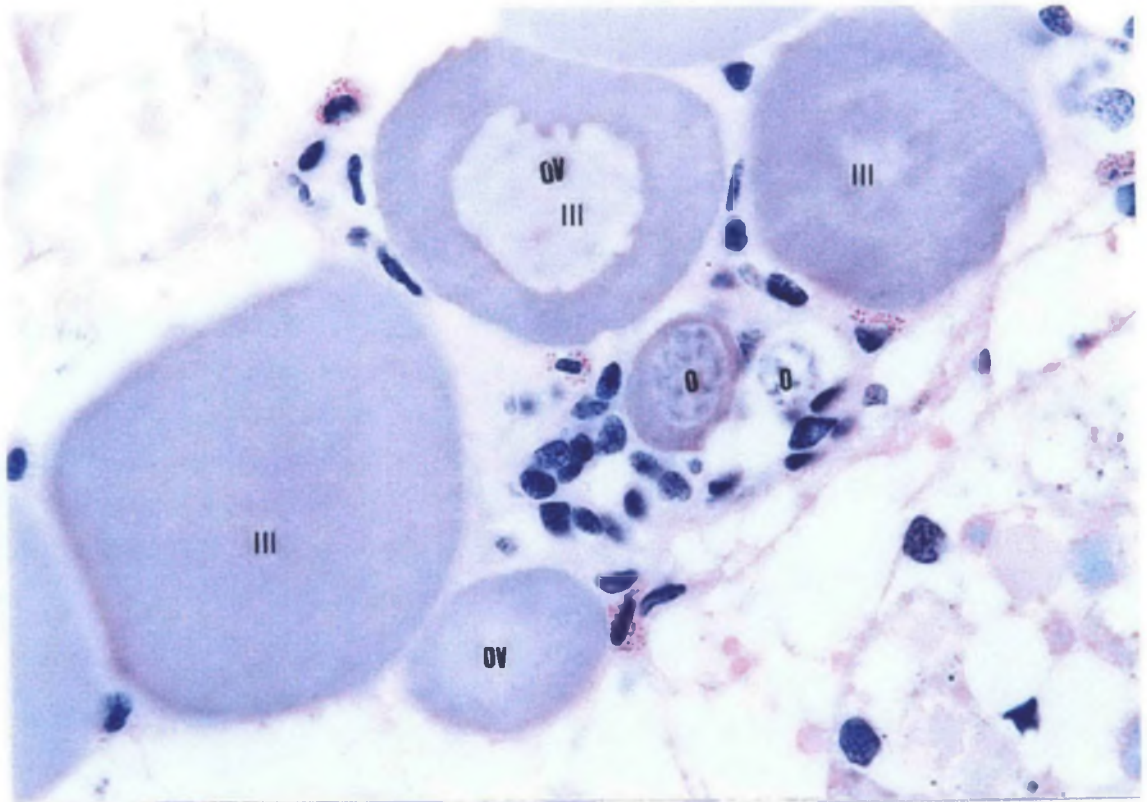


FIGURA 8: Células associadas ao ovócito. Células do epitélio (setas) estão associadas com o ovócito em desenvolvimento. Lâmina basal (cabeça da seta). Corte longitudinal de 4 μ m, coloração H.E., aumento de 630x.

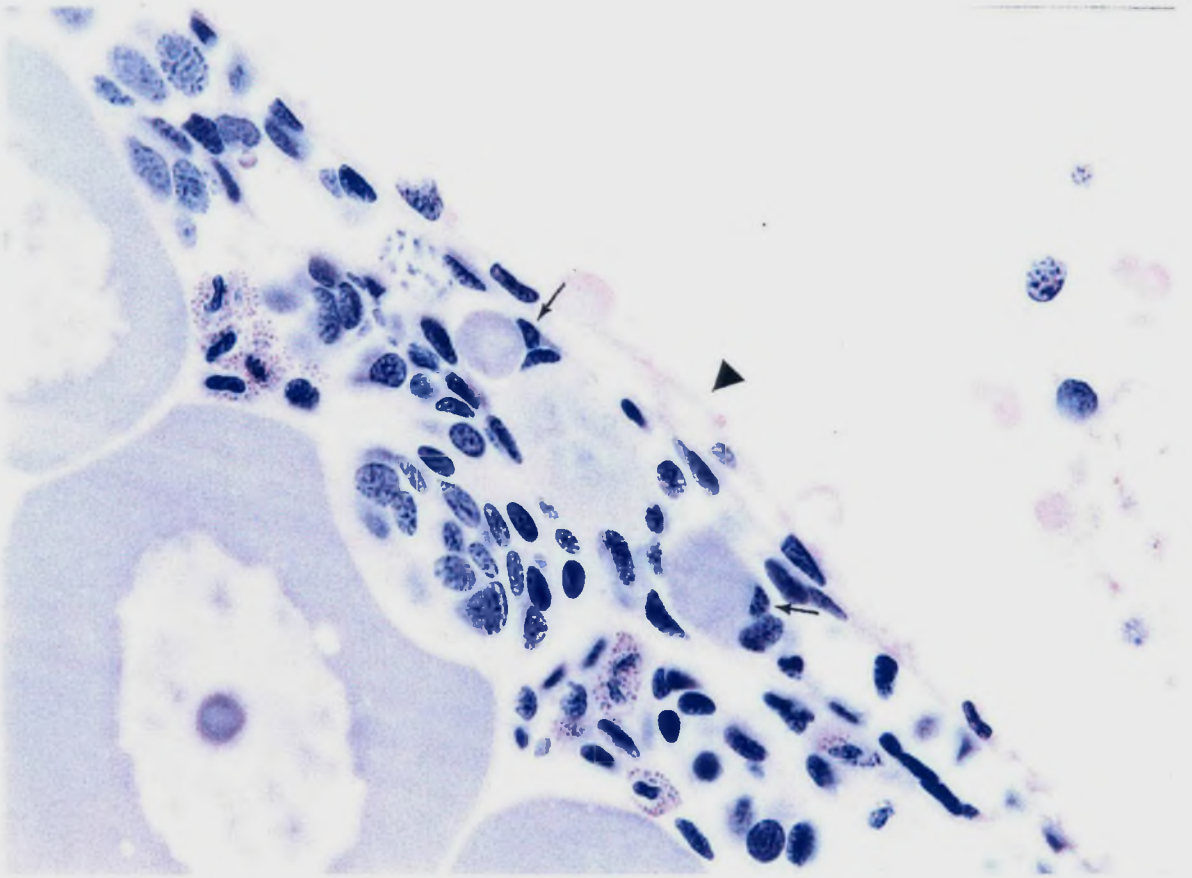


FIGURA 9: Ovócitos, aparentemente, dos dois lados do ovário. Ovócitos (ov) em estágio I –III. Aumento de 400x, corte longitudinal de 4 μ m, reação para detecção de caderina, coloração H.E.

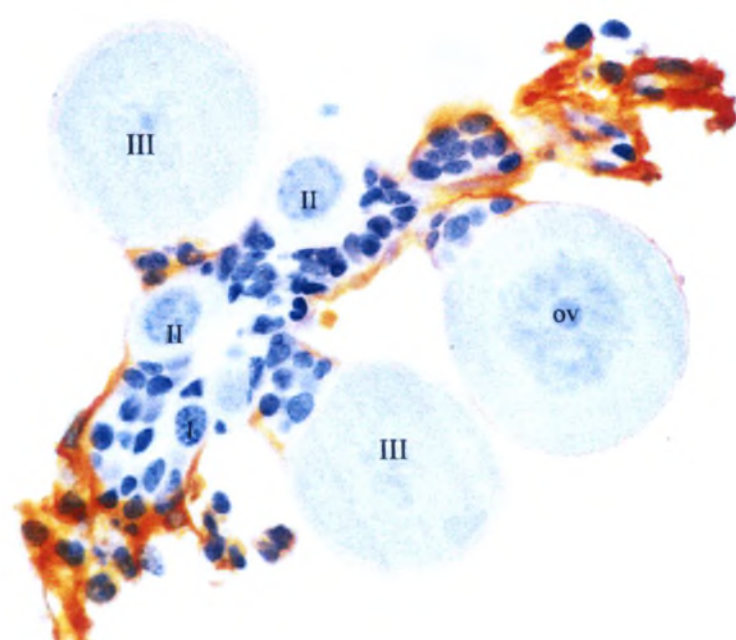


FIGURA 10: Ovócitos de aranha jovem processados para o reativo de Schiff. Ovócitos (ov) não apresentam envoltório de camada proteica. Células secretoras da seda apresentam grânulos PAS positivos (seta). Corte longitudinal de 4 μ m, reação com PAS contracorado com hematoxilina, aumento de 400x.

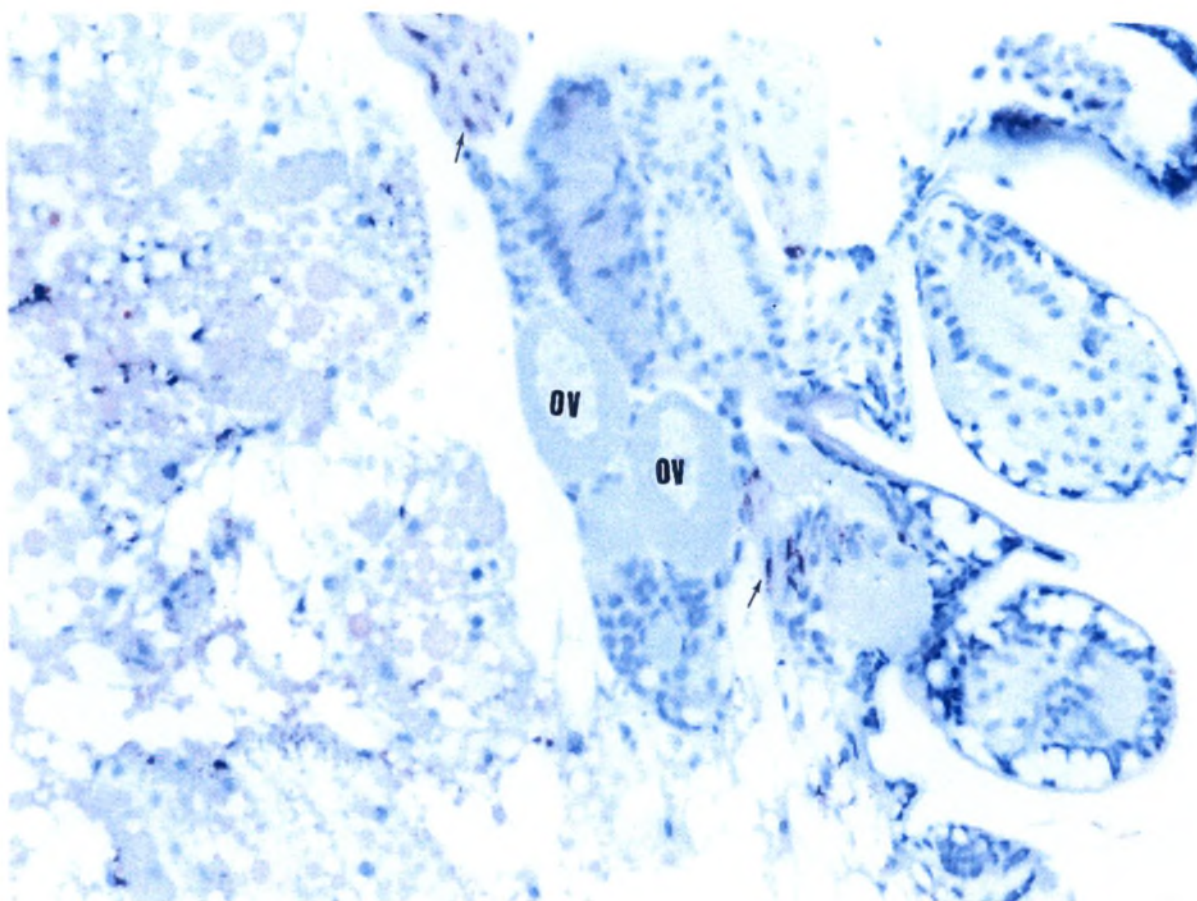


FIGURA 11: Ovócito de aranha adulta tratados com PAS. Grânulos de vitelo (v) e camada proteica (seta) na base do ovócito são PAS positivos. Aumento de 630x, corte longitudinal de 4µm, reação com PAS contracorada com hematoxilina.

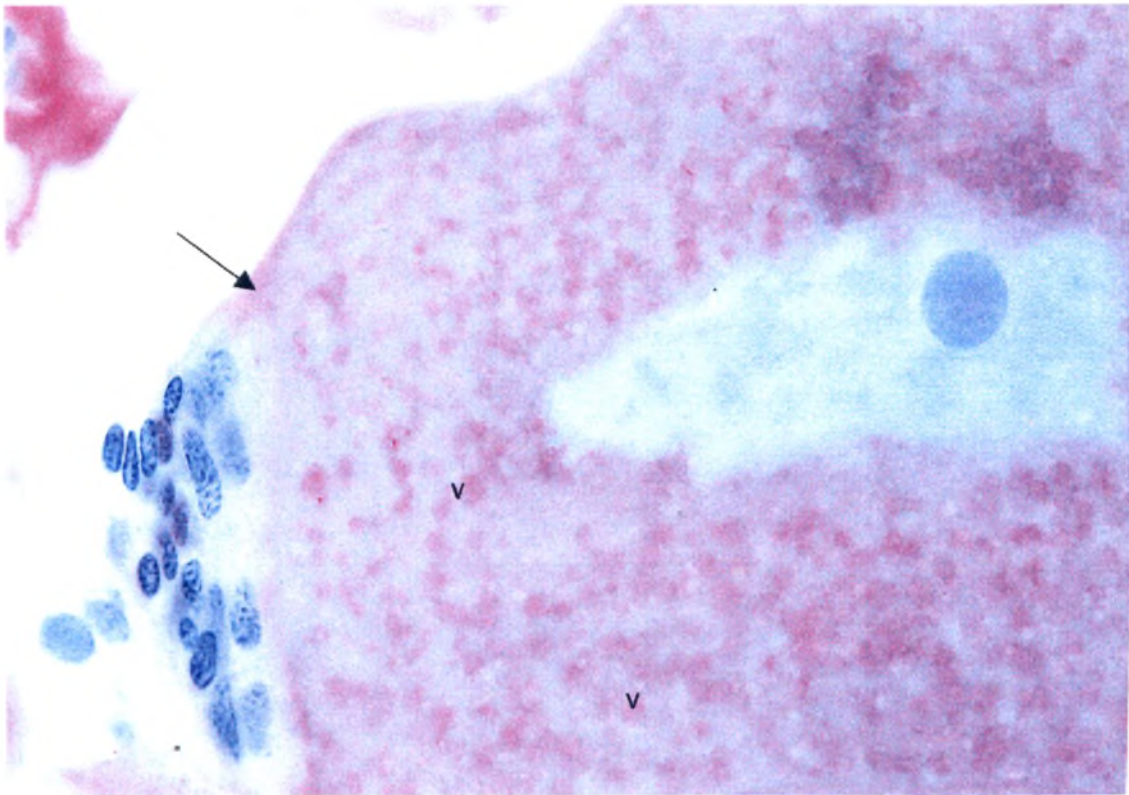


FIGURA 12 a: Grânulos no oviduto de fêmeas adultas. Grânulos maiores (seta) e menores (cabeça da seta) se encontram no oviduto de *L. intermedia*. Aumento de 200x. Coloração H.E., corte longitudinal de 3µm.

FIGURA 12b: Ovo de *L. intermedia* mostrando o córion. Grânulos de vitelo (v) apresentam organização diferente. Citoplasma (c), envoltório vitelínico (cabeça da seta), córion (seta). Aumento de 400x, coloração azul de toluidina, corte transversal de 900nm.

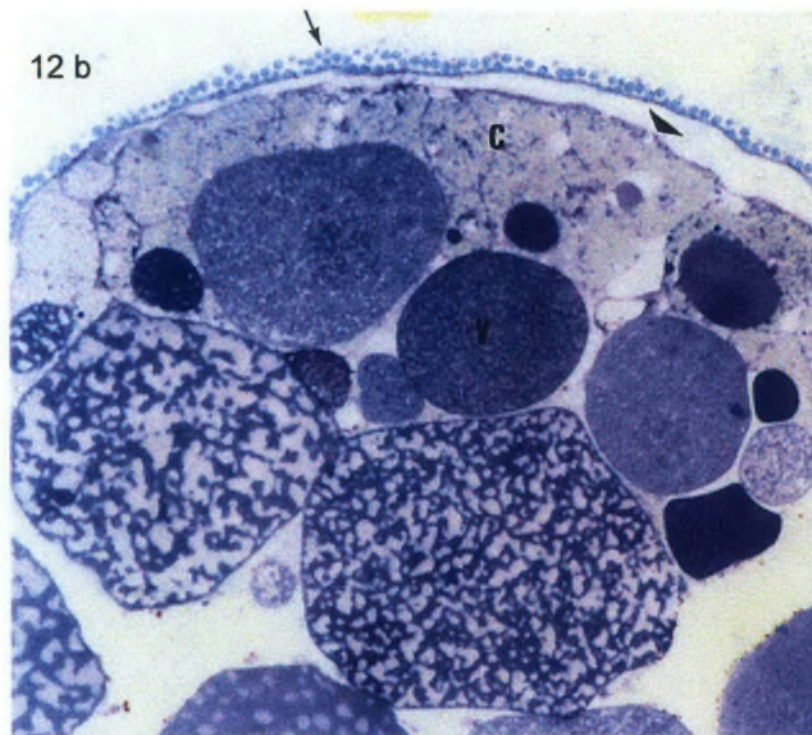
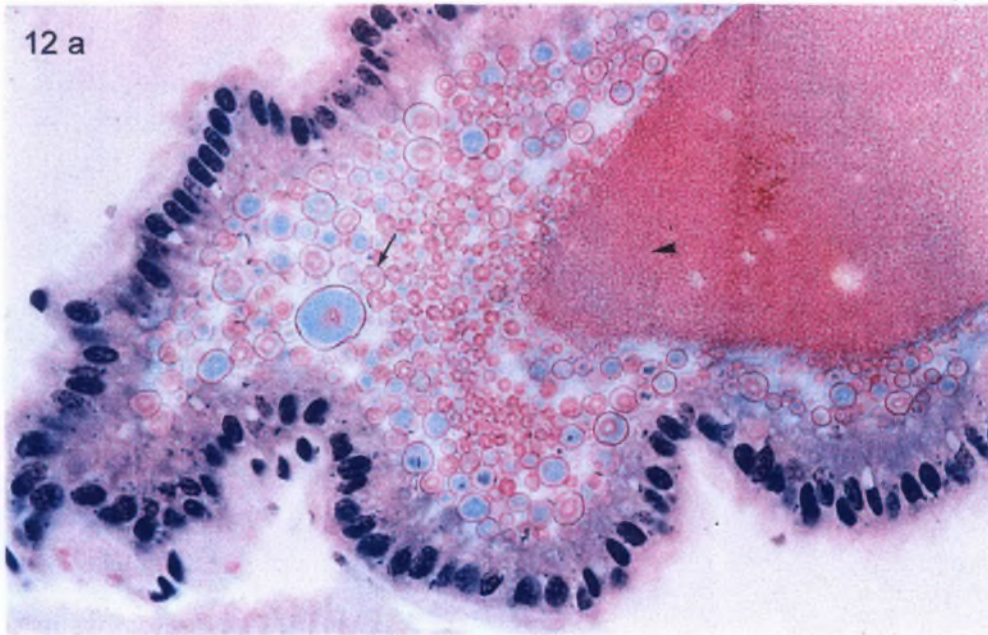


FIGURA 13: Ovócito no lúmen do ovário de fêmea adulta. Ovócito (O) no lúmen (L), antes da postura. Ovócitos (ov) em diferentes estágios de desenvolvimento na face ventral. Aumento de 100x, coloração H.E., corte longitudinal de 4 μ m.

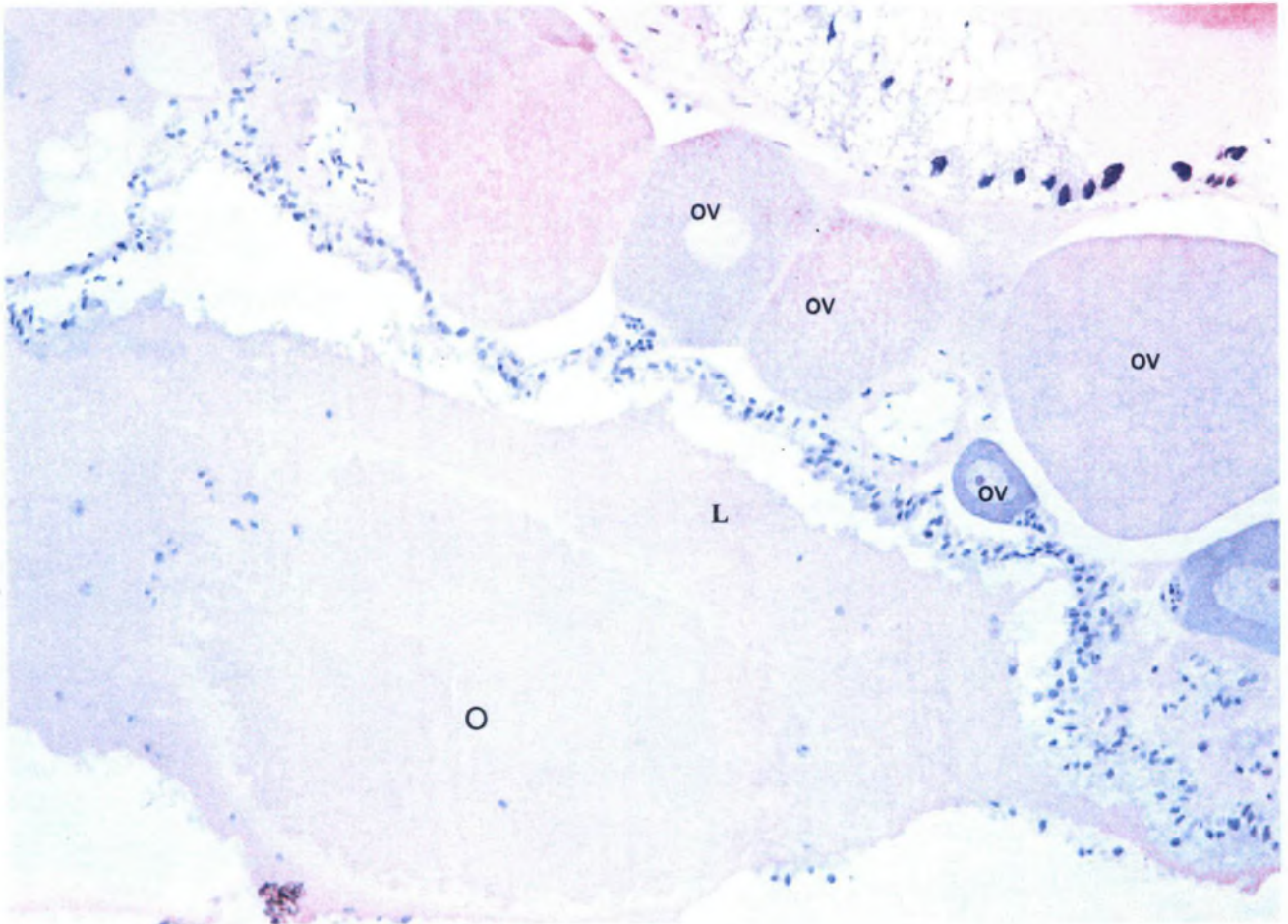


FIGURA 14: Ovócito no lúmen do ovário, evidenciando estruturas do córion. Córion (seta) e citoplasma periférico (C) são PAS negativos. Grânulos de vitelo (v) e conteúdo do lúmen (L) são PAS positivos. Aumento de 630x, corte longitudinal de 4µm, reação de PAS contracorado com hematoxilina.

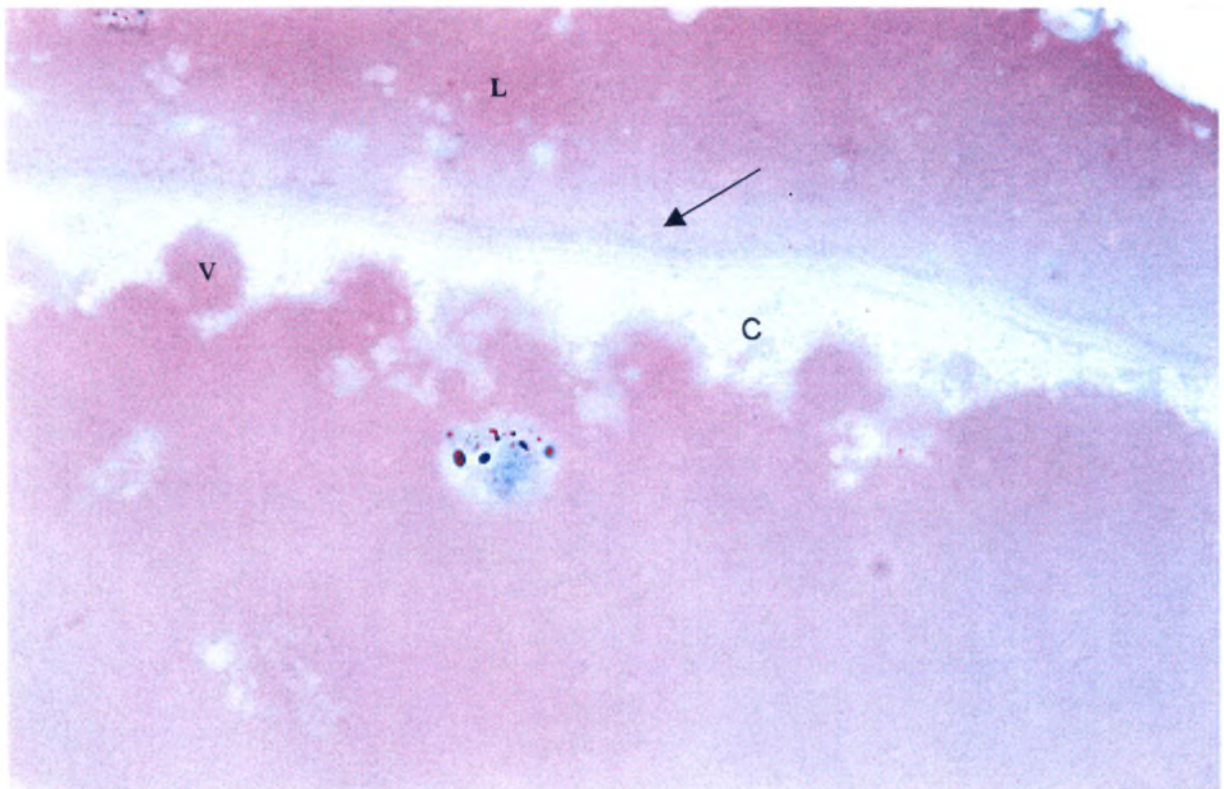


FIGURA 15: Ovócitos no estágio I marcados com anticorpo para caderina. Ovócito no estágio I (I). Corte longitudinal de 4 μ m, aumento de 400x, reação de imunocitoquímica contracorada com H.E.

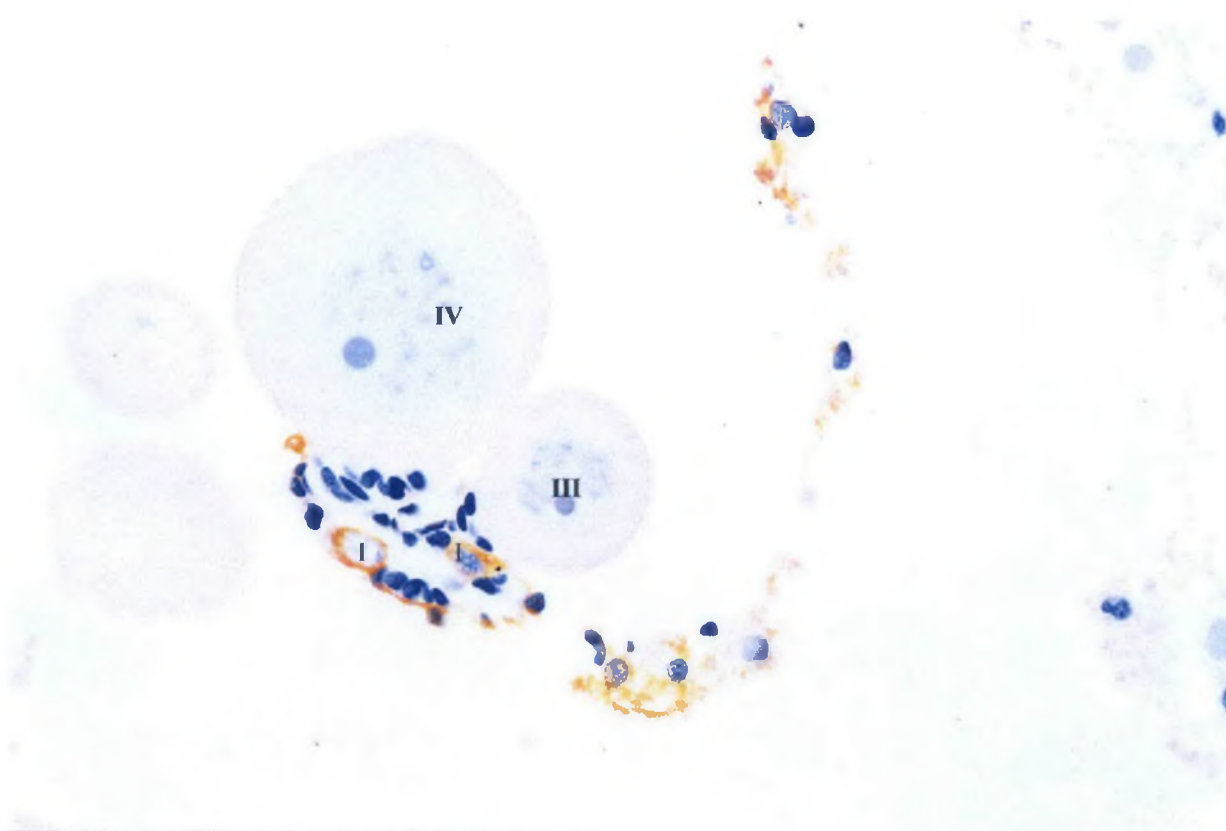


FIGURA 16: Ovócitos de estágio II – IV marcados com anticorpo para caderina. Lâmina basal e região de ligação ao hepatopâncreas, com caderinas (seta). Aumento de 200x, corte longitudinal de 4 μ m, reação imunocitoquímica contracorada com H.E.

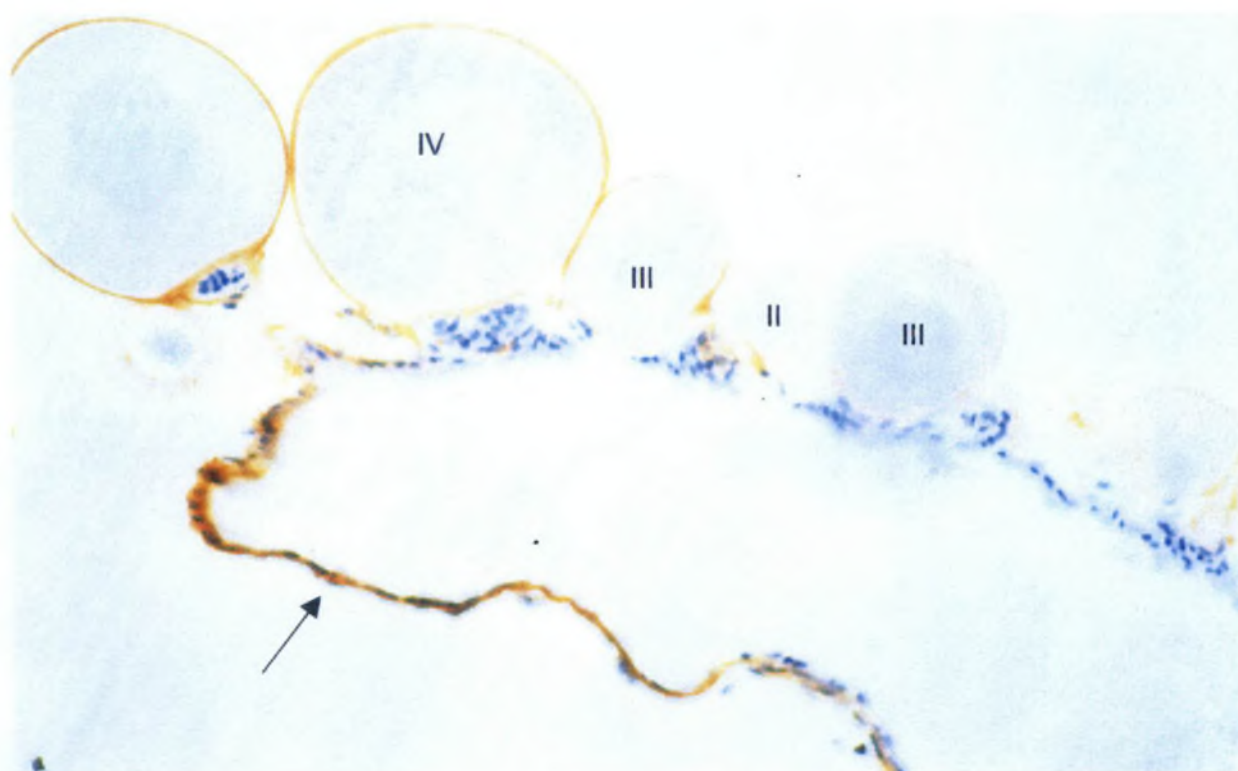
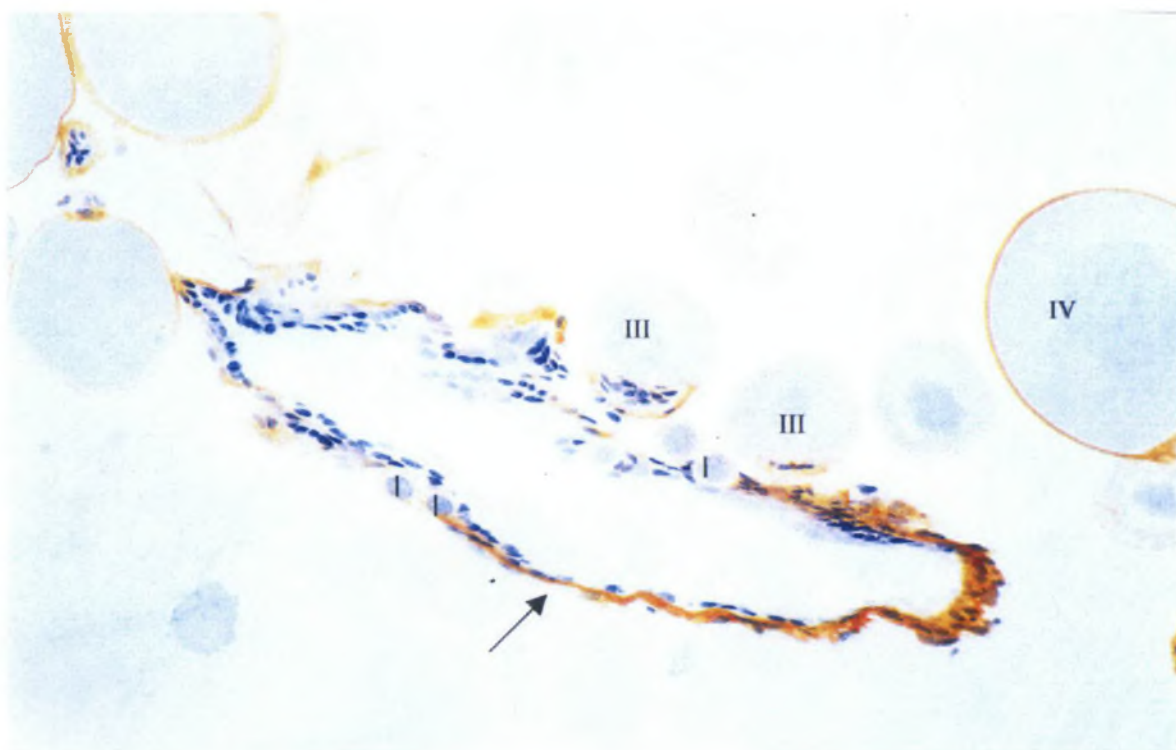


FIGURA 17: Grânulos, no interior do ovócito, marcados com anticorpo para caderina (seta). Aumento de 630x, corte longitudinal de 4 μ m, reação imunocitoquímica contracorada com H.E.



FIGURA 18: Face ventral do ovário marcada com anticorpo para caderina. Marcação (seta) em toda a extensão da face ventral. Ovócitos em estágio I em desenvolvimento na face ventral dobrada. Aumento de 200x, corte longitudinal de 4 μ m, reação imunocitoquímica contracorada com H.E.



6. CONCLUSÕES

⇒ Ainda não existem parâmetros para a diferenciação externa entre os sexos de aranhas jovens do gênero *Loxosceles*.

⇒ O ovário da aranha jovem de *L. intermedia* já apresenta a estrutura básica do ovário da aranha adulta, mas com apenas as fases iniciais da oogênese. Os ovócitos imaturos apresentam grande quantidade de RNAs no citoplasma.

⇒ Há uma grande quantidade de células germinativas em estágio inicial de desenvolvimento entre as células epiteliais no ovário da fêmea jovem.

⇒ Células do epitélio são encontradas associadas às células germinativas em desenvolvimento e sugere-se que estas células dêem origem às células do pedúnculo.

⇒ A reação imunocitoquímica, com anticorpos para a caderina, mostram que a mesma exerce ligações em grande quantidade nos ovócitos imaturos, podendo ter função de sinalização entre o ovócito e células vizinhas.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. São Paulo. Editora Artes Médicas. 1997.
- ANDRADE, R. M. G. de, et al. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.37 n.4, p. 627-32, abr 1999.
- ANDRADE, R. M. G.; LOURENÇO, W.R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, Sicariidae). **J. Arachnol.** v.28, p. 245-247, 2000.
- ARAUJO, S.C. et al. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v. 41 n.3, p. 261-7, mar 2003.
- BILINSKI S. M., BÜNING, J. Structure of ovaries and oogenesis in the snow scorpionfly *Boreus hyemalis* (linne) (Mecoptera: Boreidae). **Int. J. Insect. Morphol. Embryol.** V.27 p. 333-340, 1998.
- FISHER, L.M. **Biologia e ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae) no município de Curitiba, Paraná**. Curitiba, 1996. 137 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- FISCHER, L. M.; VASCONCELOS-NETO, J. Comportamento sexual de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae). **Revista de Etologia**, v.2, nº 1, p. 31-42, 2000.
- FRANCKE, O. F; SISSOM, W. D. Comparative review of the methods used to determine the number of molts to maturity in scorpions (Arachnida), with analysis of the post-birth development of *Vaejovis coahuilae* Williams (Vaejovidae). **J. Arachnol.** v.12 p.1-20, 1984.
- GARCIA, S. M. L. e FERNANDÉZ, C. G. **Embriologia**. 2. ed. São Paulo. Editora Artmed, 2001.
- GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in south america (Araneae, Scytodidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. V. 136 nº 3, p. 117-174. Jun, 1967.
- GILBERT. S. F. **Developmental Biology**. 4.ed. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1994.
- GIORGI, F. et al. Oocyte growth, follicle cell differentiation and vitellini processing in the stick insect, *Carasius morosus* BR, (Phasmatodea) **J. Esp. Morphol. Embryol.** v.22 n.2-4, p. 271 – 293, 1993.

IKUTA, K. e MAKIOKA, T. Structure of the adult ovary and oogenesis in *Argulus japonicus* Thiele (Crustácea: Branchiura). **Journal of Morphology**. V. 231, p. 29-39, 1997.

KOVACKS, E. M. and YAP, A. S. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. **The journal of Cell Biology**, v. 160 n.1 p.11-16, 2003.

MAZZINI, M; GIORGI, F. The follicle cell-oocyte interaction in ovarian follicles of the stick insect *Bacillus rossius* (Rossi): (Insecta: Phasmatodea). **J. Morphol.** V.185 p.37 – 49, 1985.

MIYAZAKI, K., UESHIMA, R., MAKIOKA, T. Structure of the female reproductive system and oogenetic mode in a schizomid, *Schizomus sawaday* (Arachnida, Schizomida). **Inv. Reprod. Dev.** v.40, p. 01-07, 2001.

MONTEIRO, C. L. et al. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, v.40, n.4, p.409-18, abr 2002.

MORISHITA, R.; FERREIRA, S. A.; SANTIAGO FILHA, A. C.; FARACO, C. D., Studies on oogenesis and oviposition in the Brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). **Anatomical Records**, 2003 (no prelo).

MORISHITA, R. **Estudo das interações entre ovócitos e células foliculares no ovário da aranha-marrom, *Loxosceles intermedia***. Curitiba, 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MÜLLER, A. H. J.; ANGRES, B.; HAUSEN, P. U-cadherin in *Xenopus* oogenesis and oocyte maturation. **Development**. V.114, p. 533-543, 1992

NIEWIADOMSKA, P.; GODT, D.; TEPASS, U. DE-cadherine is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. **The Journal of Cell Biology**. V. 144, p.533-547, fev, 1999.

OLIVEIRA, K. C., et al. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**. V.37, nº1, p. 217-221, 1999.

SONG, X. et al. Germiline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. **Science**. V.296, p. 1855-1857, Jun, 2002.

THE SPIDER. Itália: Nuova arti grafiche ricordi S.r.l., 1994. 1 cartaz: color.

VALENTE, M. M. **Estudo anátomo-histológico do aparelho genital da fêmea *Ramphobeteus sorocabae* Mello Leitão, 1923 (Araneae – Aviculariidae)**. Botucatu, 1984. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista.

VISCUSO, R. et al. Secretory product of the lateral oviducts of *Baculum thaili* Haus. (Phasmatidae) and its change during egg transit. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** v.25 n.4, p. 369-379, 1997.

WARBURG, M. R.; ROSEMBERG, M. The reproductive system of female *Buthotus judaicus* (Scorpiones; Buthidae). **Biological Structures and Morphogenesis** v.4, p.33-37, 1992.

WARBURG, M. R.; ELIAS, R.; ROSEMBERG, M. Ovariuterus and oocyte dimensions in the female buthid scorpion, *Leirus quinquestriatus*, H.& E. (Scorpiones: Buthidae), and the effect of higher temperature. **Invertebrate Reproduction and Development**. V.27, nº 1, p. 21-28, 1995.